Aus dem medizinisch-chemischen Institut der Universität Bern

Direktor: Prof. Dr. med. H. Aebi

BELASTUNGSVERSUCHE MIT ^{14}C- UND D-MARKIERTEM FORMIAT AN DER RATTE

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung
der Doktorwürde der medizinischen Fakultät
der Universität Bern

vorgelegt von

Peter Siegenthaler

von Bern und Trub

ARNAUD DRUCK BERN 1956

Aus dem medizinisch-chemischen Institut der Universität Bern

Direktor: Prof. Dr. med. H. Aebi

BELASTUNGSVERSUCHE MIT ^{14}C- UND D-MARKIERTEM FORMIAT AN DER RATTE

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung
der Doktorwürde der medizinischen Fakultät
der Universität Bern

vorgelegt von

Peter Siegenthaler

von Bern und Trub

ARNAUD DRUCK BERN 1956

Von der Medizinischen Fakultät auf Antrag des Herrn Prof. Dr. H. Aebi zum Druck als Dissertation genehmigt.

Bern, den 12. Juli 1956

Der Dekan der Medizinischen Fakultät:

Prof. Dr. W. Wilbrandt

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

INHALTSUEBERSICHT

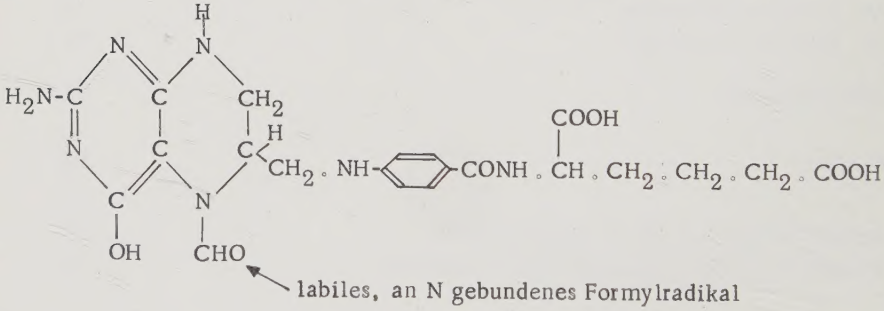
	Seite
EINLEITUNG	4
METHODIK	7
I. Darstellung von "leichtem" und "schwerem" Na-Formiat ($H^{14}COONa$ und $D^{14}COONa$); Aktivitätsbestimmung der verwendeten Formiatproben	7
II. Bestimmung des radioaktiven $^{14}CO_2$ in der Ausatmungsluft	7
III. Isolierung des Formiates aus dem Harn und Bestimmung seiner Radioaktivität	10
ERGEBNISSE	13
I. Zeitlicher Verlauf der Fo Applikationsart	
A. Perorale Belastung	3
B. Subkutane Belastung	7
C. Intraperitoneale Bel	9
II. Die Formiatausscheidu	20
A. Subkutane Belastur	20
B. Perorale Belastung	23
III. Bilanzversuche	23
DISKUSSION	24
I. Isotopieeffekte bei der Formiatoxydation	24
II. Berechnung des endogen gebildeten Formiates	30
ZUSAMMENFASSUNG	32
LITERATURVERZEICHNIS	34

EINLEITUNG

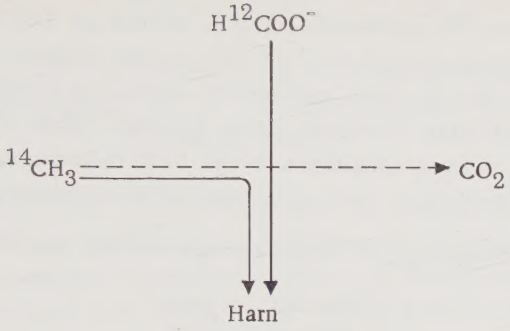
Die Ameisensäure spielt im intermediären Stoffwechsel deswegen eine bedeutende Rolle, weil sie eng mit der Bildung und Oxydation biologisch labiler Methylgruppen ($-CH_3$) verknüpft ist. Unter dem Begriff der biologisch labilen Methylgruppen sind nach dem Vorschlag von Du Vigneaud CH_3-Radikale zu verstehen, die leicht von einer Verbindung auf eine andere verschoben werden können. Diese Uebertragung wird Transmethylierung genannt. Als Methyldonatoren kommen vor allem Methionin und Cholin, die von aussen mit der Nahrung zugeführt werden, in Frage. Dass der Organismus aber ausserdem imstande ist, CH_3-Gruppen selbst zu synthetisieren, darf durch die Versuche von Du Vigneaud (1) als sicher gestellt angesehen werden.

Ausgangsmaterial für die Biosynthese labiler CH_3-Gruppen ist Formiat in Form von aktivierter Ameisensäure. Zakrewski und Nichol (2) nehmen an, dass diese als Formylrest, gebunden in Stellung 7 an die Tetrahydrofolsäure, vorliegt. Diese Verbindung stellt den Citrovorumfaktor dar. Die Formylgruppe wird bei der Synthese der Methylgruppen auf einen geeigneten Akzeptor übertragen. In Anlehnung an das Coenzym A, der aktivierten Essigsäure, wurde vorgeschlagen, den Citrovorum-Faktor als Coenzym F zu bezeichnen (Fig. 1).

Fig. 1. Struktur des Citrovorumfaktors (= Coenzym F = Aktivierte Ameisensäure).
7, 8, 9, 10-Tetrahydro-7-formyl-pteroylglutaminsäure



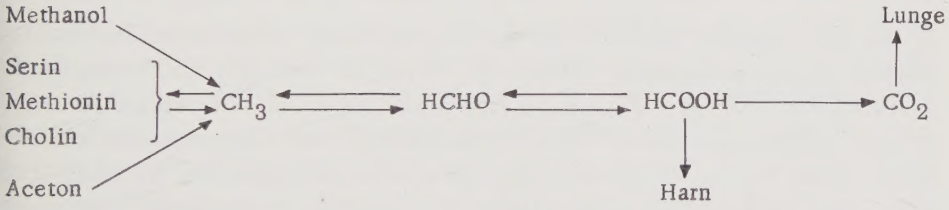
Anderseits ist der Organismus imstande Methylgruppen ($-CH_3$) oxydativ zu CO_2 und H_2O abzubauen. Dies ist vor allem dann der Fall, wenn ihm Methylgruppen-tragende Verbindungen wie z.B. Methionin oder Cholin in Ueberschuss zugeführt werden. Weinhouse (3) zeigte, dass diese Oxydation via Formaldehyd und Formiat verläuft. Das bei diesem Abbau im Körper gebildete Formiat wird durch gleichzeitig von aussen in grösserer Menge zugeführtes Formiat mitgerissen und mit diesem zusammen im Harn ausgeschieden.



Weinhouse injizierte nach Formiatbelastung Substanzen, die ^{14}C markierte Methylgruppen enthielten. Auf diese Weise konnte festgestellt werden, dass die Methylgruppen von Sarkosin, Betain, Serin, Methionin, Cholin und Aceton beim oxydativen Abbau Ameisensäure liefern können.

Die Ameisensäure nimmt demnach bei der Biosynthese und beim Abbau der biologisch labilen Methylgruppen eine zentrale Stellung ein: der oxydative Abbau der CH_3-Gruppen führt über das Formaldehyd und die Ameisensäure zum CO_2. Dieser Weg wird bei der Biosynthese der CH_3-Gruppen aus Ameisensäure in umgekehrter Richtung beschritten (4).

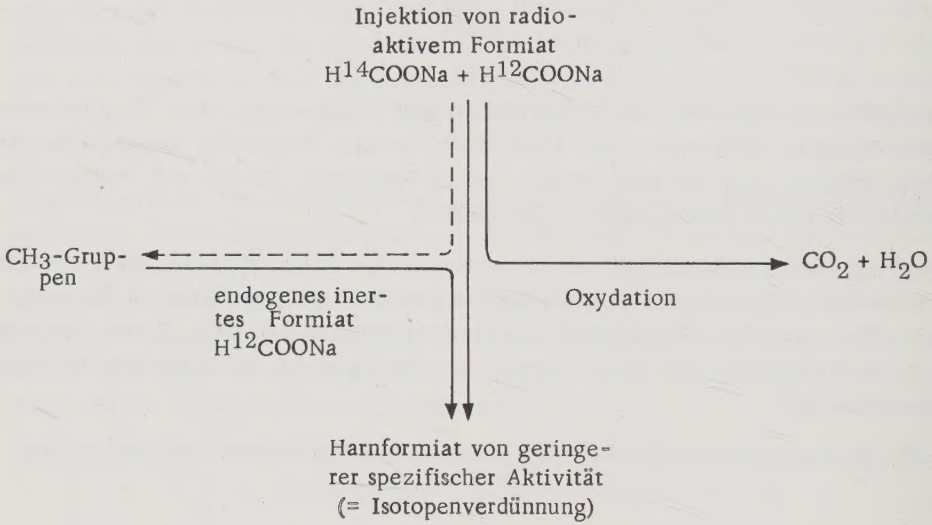
Fig. 2. Oxydation und Reduktion der Ameisensäure im intermediären Stoffwechsel.



Vom menschlichen Organismus werden täglich etwa 30 mg Ameisensäure im Harn ausgeschieden. Diese stammen hauptsächlich aus der Nahrung. Mit ihr gelangen Aminosäuren mit labilen Methylgruppen wie Methionin und Betain in den Körper. Eine wichtige Quelle stellen ferner die Pektine der Pflanzen dar, worauf bereits von Fellenberg (5) hingewiesen hat. Diese methylierten Polygalakturonsäureester liefern durch Oxydation der Methoxylgruppen ($-O-CH_3$) beträchtliche Mengen Ameisensäure.

Injiziert man Ratten ^{14}C-markiertes Formiat, so wird ein Teil zu CO_2 oxydiert und in der Ausatmungsluft ausgeschieden. Ein Teil dagegen verlässt den Körper im Harn. Die Radioaktivität des im Harn auftretenden Formiates ist dabei im Vergleich zu derjenigen des injizierten Formiates etwas geringer. Diese Verdünnung hat ihren Grund darin, dass endogen gebildetes, somit nicht radioaktives Formiat mitausgeschieden wird. Dieser Vorgang wird als Isotopenverdünnung bezeichnet (Fig. 5).

Fig. 5. Ausscheidungswege des bei Belastungsversuchen verabreichten Formiates.



In der vorliegenden Arbeit wurde die Oxydation der Ameisensäure bei der Ratte studiert. Um den zeitlichen Ablauf der Oxydation verfolgen zu können, wurden Belastungsversuche mit ^{14}C-markierten und Deuterium-^{14}C-doppeletikettierten Formiat ($H^{14}COONa$ und $D^{14}COONa$) ausgeführt, wobei das unterschiedliche Verhalten dieser beiden Formiatarten geprüft wurde (=Isotopieeffekt). Als Mass für die Grösse der Oxydation wurde der Gehalt an $^{14}CO_2$ in der Ausatmungsluft verwendet. Ferner wurde der Einfluss der Dosierung auf das Ausmass der Isotopenverdünnung untersucht und auf Grund der gemachten Beobachtung die Grössenordnung des endogen gebildeten Formiates zu berechnen versucht.

METHODIK

I. DARSTELLUNG VON "LEICHTEM" UND "SCHWEREM" NATRIUMFORMIAT ($H^{14}COONa$ UND $D^{14}COONa$); AKTIVITAETSBESTIMMUNG DER VERWENDETEN FORMIATPROBEN

a) Darstellung des Natriumformiates: Zur Herstellung des radioaktiven Natriumformiates $H^{14}COONa$ dienten 0.5 Millicurie $Na^{14}C$-Formiat*. Diese Substanz wurde mit mehrmals umkristallisiertem gewöhnlichem Natriumformiat (HCOONa) derart verdünnt (ca 1:100), dass eine Radioaktivität von 2'030'000 counts/Min/mAeq resp. eine solche von 158'800 counts/Min/mAeq resultierte.

Das Deuterium-markierte Natriumformiat ($D^{14}COONa$) wurde durch Verseifen von radioaktivem Cyanid* mit schwerem Wasser (D_2O) gewonnen. Die auf diese Weise hergestellte Verbindung wurde anschliessend mit schwerem nicht radioaktivem Natriumformiat (DCOONa) bis auf eine Aktivität von 1'457'000 resp. 150'600 counts/Min/mAeq verdünnt.

b) Bestimmung der Radioaktivität nach Ueberführung der Proben in $Ba^{14}CO_3$: Die Radioaktivität dieser Substanzen wurde durch feuchte Verbrennung nach der von Van Slyke-Folch angegebenen Methode (6) und nach Ueberführung des freigesetzten radioaktiven $^{14}CO_2$ in Bariumkarbonat mit dem Endfenster-Geiger-Müller-Zählrohr bestimmt. Dabei wurde im einzelnen so vorgegangen, dass das aus 3-4 mg durch das oxydierende Säuregemisch freigesetzte $^{14}CO_2$ in 3 ml kohlensäurefreier 1n NaOH aufgefangen wurde. Die Falle wurde anschliessend in ein 50 ml Messkölbchen übergeführt. Ein aliquoter Teil (z.B. 15 ml) wurde mit einer bestimmten Menge 0,2n Natriumkarbonatlösung versetzt, sodass sich das zu erwartende Gewicht des $BaCO_3$-Plättchens (sog. "Pad") um 50 mg bewegte. Nach Zufügen einer aequivalenten Menge 2m Ammoniumchloridlösung zum Puffern, wurde das Natriumkarbonat im kochenden Wasserbad erhitzt und durch Zusatz von 1m Bariumchloridlösung als Bariumkarbonat ausgefällt. Das auf diese Weise ausgeflockte $BaCO_3$ wurde durch ein rundes Filterpapier von 18,2 mm Durchmesser filtriert. Das derart hergestellte Pad wurde weiter während 10 Minuten unter der Infrarotlampe getrocknet, analytisch gewogen und dann mit dem Geiger-Müller-Zählrohr ausgezählt.

II. BESTIMMUNG DES RADIOAKTIVEN $^{14}CO_2$ IN DER AUSATMUNGSLUFT

Männlichen Ratten von 210-290 Gramm Körpergewicht, welche 4 Tage vor Versuchsbeginn synthetisches Futter nach einer von Du Vigneaud (7,8) angegebenen Zusammensetzung erhalten hatten, wurde das radioaktive Formiat in Form 1n Lösungen appliziert. Dieses wurde entweder mit der Schlundsonde eingegeben, unter die Haut

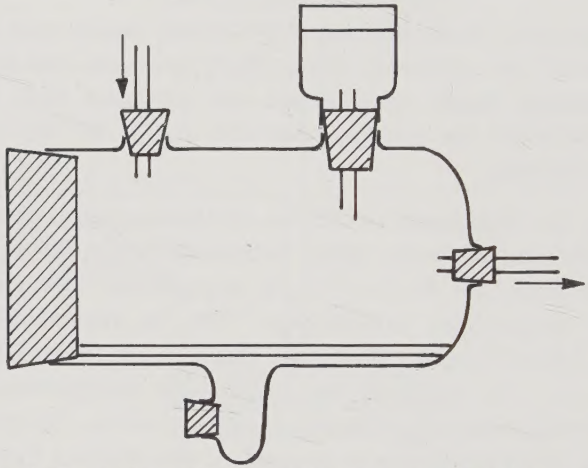
---

* Bezugsquelle: Radiochemical Centre Amersham, England.

des Rückens oder direkt intraperitoneal injiziert, wobei das Tier zur Vermeidung einer Darmverletzung durch die vorn abgerundete Injektionsnadel in Kopflage gehalten wurde. Zwölf Stunden vor dem Versuch wurde den Tieren das Futter entzogen.

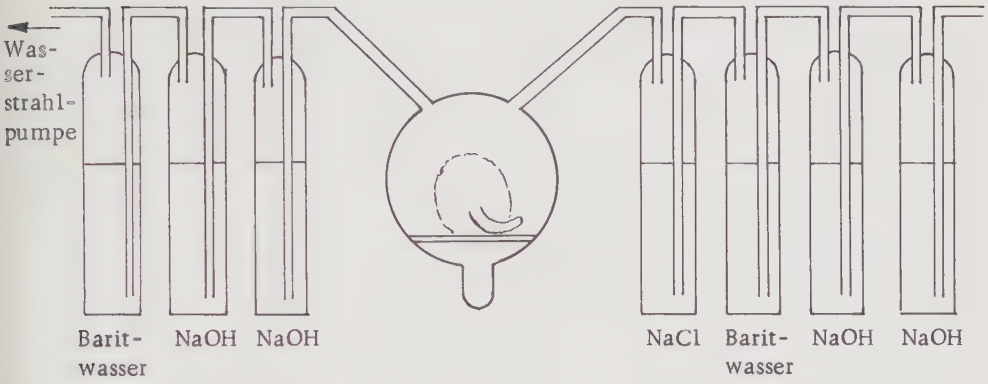
Die Ratte wurde in einen Behälter aus Glas eingeschlossen (Fig. 6), dessen Form so gewählt war, dass der tote Raum auf ein Minimum reduziert wurde. Die Grösse war so bemessen, dass sich das Tier darin eben noch gut bewegen konnte. Neben einer Eintritts- und Austrittsöffnung für die Luft war eine Oeffnung für die Wasserflasche angebracht. Der Boden enthielt eine Ausbuchtung für den Harn.

Fig. 6. Stoffwechselkäfig



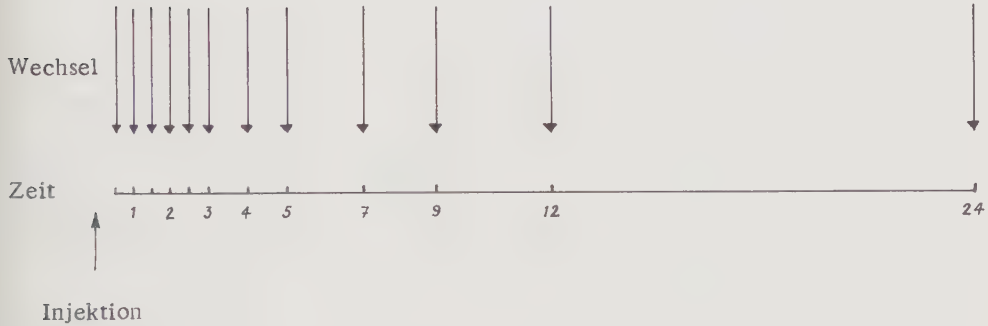
Die eintretende Luft wurde mittelst zweier Gaswaschflaschen enthaltend zehnprozentige CO_2-freie NaOH und einer Waschflasche mit Barytwasser als Kontrolle von ihrer Kohlensäure befreit. Die vierte Flasche mit einer gesättigten NaCl-Lösung diente zur Regulation der Luftfeuchtigkeit. Die Ausatmungsluft wurde durch zwei hintereinandergeschaltete Gaswaschflaschen mit zehnprozentiger CO_2-freier NaOH geleitet. Darin wurde die Kohlensäure quantitativ abgefangen. Mit Hilfe eines Dreiweghahns konnte der Luftstrom über zwei verschiedene Serien hintereinandergeschalteter Gaswaschflaschen geführt werden. Diese Vorrichtung gestattete ein Auswechseln der Waschflaschen ohne Unterbrechung des Versuches. Eine weitere angeschlossene Flasche mit Barytwasser diente als Kontrolle. Eine Wasserstrahlpumpe sorgte für einen kontinuierlichen Luftstrom (Fig. 7).

Fig. 7. Versuchsanordnung zum Auffangen des Ausatmungs-CO_2.



Die Gaswaschflaschen wurden während der ersten drei Stunden alle 30 Minuten, anschliessend alle Stunden und zwei Stunden ausgewechselt und deren Inhalt auf die Radioaktivität des $^{14}CO_2$ untersucht (Fig. 8).

Fig. 8. Zeitschema für den Wechsel der Gaswaschflaschen.



Tab. 1. Berechnung der gesamten in den verschiedenen Beobachtungsperioden aufgefangenen CO_2-Menge (als $BaCO_3$).

Zeitintervall	Gewicht des $BaCO_3$-Pad mg	Gesamtmenge der Falle ml A	Entnommene Probe ml B	Extrapolationsfaktor $E \frac{A}{B}$	Totale Menge $BaCO_3$ mg
0 - 30 Min	45.75	400	12	33.3	1525
30 - 60	42.80	200	6	33.3	1427
60 - 90	37.70	400	12	33.3	1257
90 - 120	38.75	200	6	33.3	1292
120 - 150	35.80	400	12	33.3	1193
150 - 180	32.50	200	6	33.3	1083
3 - 4 Std	45.15	400	6	66.6	3010
4 - 5	31.65	200	3	66.6	2110
5 - 7	39.30	400	3	133.3	5240
7 - 9	33.80	200	1.5	133.3	4507
9 - 12	46.50	400	1.5	266.6	12410
12 - 24	35.15	400	0.6	666.6	23460

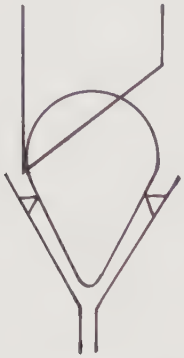
Die Waschflaschen enthielten je nach Grösse 50 oder 100 ml 10 %-NaOH. Nach dem Auswechseln wurde der Inhalt der Flaschen in einen Erlenmeyerkolben übergeführt und durch Nachspülen auf ein Volumen von 200 resp. 400 ml aufgefüllt.

Ein aliquoter Teil diente zur Herstellung von $BaCO_3$-Plättchen in der oben beschriebenen Weise. Wie aus Tabelle 1 ersichtlich ist, wurde der entnommene aliquote Teil so gross gewählt, dass das Gewicht des $BaCO_3$-Plättchens zwischen 30 und 70 mg zu stehen kam. Aus diesem Wert liess sich die Gesamtmenge Bariumkarbonat in den Gaswaschflaschen im entsprechenden Zeitabschnitt berechnen.

III. ISOLIERUNG DES FORMIATES AUS DEM HARN UND BESTIMMUNG SEINER RADIOAKTIVITAET

Männliche Ratten von 230-270 Gramm Gewicht wurden in einem grossen Glastrichter von ca 30 cm Durchmesser gehalten. Sie erhielten die oben erwähnte synthetische Futtermischung vier Tage vor Versuchsbeginn. Diese schlackenarme Kost ergab kleine und harte Kotballen. Eine Verunreinigung des Harns durch Futterreste und Kot konnte durch die in Fig. 9. dargestellte Sammelvorrichtung verhindert werden.

Fig. 9. Vorrichtung für das Sammeln des Rattenharns.

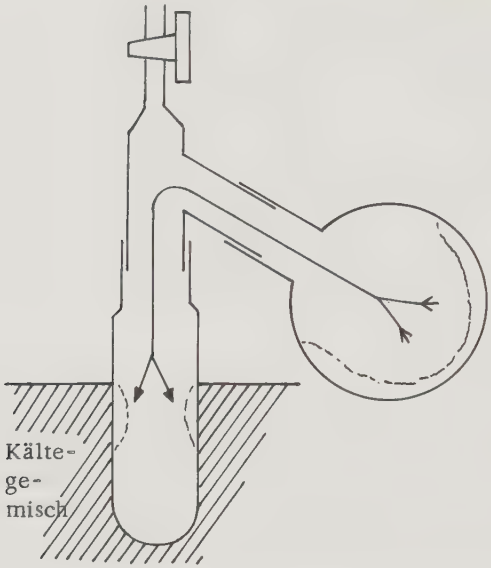


Der filtrierte Rattenharn wurde nach Ansäuern mit 2 ml konzentrierter Phosphorsäure bei reduziertem Druck und 65° Celsius destilliert, und die flüchtige Ameisensäure unter Verwendung eines Rückflusskühlers in einer bekannten Menge ln Natronlauge aufgefangen. Der Basenüberschuss der Falle wurde mit ln Salzsäure titriert. Daraus liess sich annähernd die Menge der überdestillierten Ameisensäure berechnen. Ein aliquoter Teil enthaltend 0,03 - 0,06 mAeq Ameisensäure wurde mit Kaliumpermanganat nach dem Prinzip von Stamm (9) titriert. Es wurde dabei dem Umstand Rechnung getragen, dass die Oxydation der gewöhnlichen Ameisensäure (HCOOH) durch das Kaliumpermanganat in 10 Minuten vollständig erfolgt, während die Umsetzung der Deuterium-markierten Ameisensäure (DCOOH) erst nach ca 30 Minuten näherungsweise beendet ist (10).

Der Falleninhalt wurde bei alkalischer Reaktion und bei reduziertem Druck bis auf ein Volumen von ca 20 ml eingedampft. Die weitere Einengung bis ca 2ml erfolgte im Sandbad mit Hilfe eines heissen Stichstoffstroms.

Zur eigentlichen Isolierung des Formiates wurde das Verfahren der Gefriertrocknung und anschliessender Sublimation angewandt. Die Apparatur bestand aus einem Schenkelrohr mit Vakuumhahn. An dieses Rohr war ein Rundkolben von ca 50 ml Inhalt und ein zylindrisches Glas von gleicher Grösse angesetzt (Fig. 10). Um absolute Dichtung zu erzielen, wurden alle Verbindungen in Normalschliff ausgeführt. Der Winkel des Schenkelrohres wurde ziemlich spitz gewählt, um zu verhüten, dass kleine Stücke Natriumsulfat während der Sublimation vom Rundkölbchen in das zylindrische Glas geschleudert wurden.

Fig. 10. Apparatur zur Sublimation von Ameisensäure.



Das auf 1.5 - 2.0 ml eingeengte Harndestillat wurde quantitativ in das Rundkölbchen übergeführt. Nach Ansäuern mit 5n Schwefelsäure wurde der Inhalt rasch eingefroren, und die Apparatur evakuiert. Anschliessend wurde das zylindrische Glas zur Ingangbringung der Sublimation in ein Kältegemisch, bestehend aus fester Kohlensäure und Aceton-Alkohol, gestellt. Der Inhalt des Rundkölbchens verflüssigte sich anfänglich, sodass die Sublimation erst nach erneutem Gefrieren und Evakuieren richtig einsetzte. Nach Ablauf von fünf Stunden war die feste Ameisensäure zusammen mit dem Eis vollständig vom Rundkölbchen in das zylindrische Glas sublimiert. In diesem Zeitpunkt bestand der Inhalt des Rundkölbchens nur noch aus trockenem Natriumsulfat:

$$2\ HCOONa + H_2SO_4 \longrightarrow 2\ HCOOH + Na_2SO_4$$

Die Eiskristalle und die feste Ameisensäure wurden aufgetaut, mit einigen Tropfen 20 % Natronlauge neutralisiert und durch tropfenweise Zugabe von 2n Salpetersäure schwach angesäuert. Nun wurde eine aequivalente Menge In Bleinitrat zugesetzt, wobei das Ergebnis der titrimetrischen Bestimmung als Richtlinie diente. Nach kurzer Zeit setzte die Kristallisation des Bleiformiates ein, wobei der Vorgang durch tropfenweisen Zusatz von absolutem Alkohol beschleunigt wurde. Die Bleiformiatproben wurden durchschnittlich vier bis fünf Mal umkristallisiert bis eine Konstanz der Radioaktivität erreicht war. Zu diesem Zweck wurde das Bleiformiat in einer kleinen Menge heissen Wassers aufgelöst, abgenutscht und nach Abkühlen und Alkoholzugabe zur Kristallisation gebracht. Die einzelnen Proben wurden im Vakuum

über Phosphorpentoxyd getrocknet und nach der Methode von Van Slyke-Folch der feuchten Verbrennung unterworfen. Nach Ueberführen des freigesetzten $^{14}CO_2$ in Bariumkarbonat wurde dieses in beschriebener Weise mit dem Geiger-Müller-Zählrohr ausgezählt.

ERGEBNISSE

I. ZEITLICHER VERLAUF DER FORMIATOXYDATION BEI VERSCHIEDENER APPLIKATIONSART.

A. Perorale Belastung

Den Tieren wurde ^{14}C-markiertes und Deuterium-^{14}C-doppeletikettiertes Natriumformiat mit der Schlundsonde eingegeben gemäss folgendem Schema:

Datum	Ratte	Appliziertes Formiat	Radioaktivität counts/Min/mAeq	Dosis mAeq/100g Gewicht
23.3.56	A	$H^{14}COONa$	2°030°000	0.5
28.3.56	B	$H^{14}COONa$	2°030°000	0.5
21.3.56	C	$D^{14}COONa$	1°457°000	0.5
3.4.56	D	$D^{14}COONa$	1°457°000	0.5

Die Ausatmungsluft wurde nach dem in Fig. 8 dargelegten Schema auf den Gehalt an radioaktiver Kohlensäure ($^{14}CO_2$) analysiert.

Bei der Ratte No. D (Gewicht = 311 g) wurden z.B. total 106.95 mg $D^{14}COONa$, einer Gesamtaktivität von 2°154°000 counts/Min entsprechend, appliziert. In den ersten 30 Minuten wurde in 12 ml des Waschflascheninhaltes eine Radioaktivität von 2734 counts/Min festgestellt. Die Aktivität des gesamten Inhaltes (400 ml) betrug somit $\frac{400}{12} \times 2734 = 91°000$ counts/Min. In den ersten 30 Minuten waren demnach $\frac{91\,000}{2°154\,000} \times 100 = 4.29$ % (=4.58 mg) des applizierten Formiates oxydiert worden
Die 4.58 mg Formiat aequivalente Menge Bariumkarbonat beträgt 13.3 mg. Da im Zeitintervall von 30 Minuten der Inhalt der Waschflasche eine CO_2-Menge entsprechend 1525 mg $BaCO_3$ enthielt, waren somit $\frac{13.3}{1525} \times 100 = 0.87$ % des ausgeatmeten CO_2 aus dem injizierten radioaktiven Formiat gebildet worden.

Tab. 2. Radioaktivität des Ausatmungs-CO_2.

Zeitintervall	Radioaktivität der entnommenen Probe counts/Min	Gesamtmenge der Falle ml A	Entnommene Probe ml B	Extrapolations-Faktor $E = \frac{A}{B}$	Gesamtradioaktivität
0 - 30 Min	2734 2812	400	12	33.3	91°000 93°700
30 - 60	5063 5026	200	6	33.3	168°800 167°300
60 - 90	4764 4901	400	12	33.3	158°800 163°400
90 - 120	4340 4407	200	6	33.3	144°700 146°900
120 - 150	3371 3269	400	12	33.3	112°300 108°900
150 - 180	2032 2000	200	6	33.3	67°700 66°700
3 - 4 Std	948 985	400	6	66.6	63°200 65°700
4 - 5	273 264	200	3	66.6	18°200 17°600
5 - 7	170 169	400	3	133.3	22°700 22°500
7 - 9	101 98	200	1.5	133.3	13°500 13°100
9 - 12	73 74	400	1.5	266.6	19°500 19°700
12 - 24	36 38	400	0.6	666.6	24°000 23°700

Die rechnerische Auswertung eines solchen Versuches ist in den Tabellen 2, 3 und 4 dargelegt. Bei diesem Versuch wurde eine männliche Ratte von 311 g Gewicht einer Belastung von 106.95 mg Formiat ($D^{14}COONa$) mit einer Gesamtradioaktivität von 2°154°000 counts/Min unterworfen.

Tab. 3. Berechnung des oxydierten Formiates.

Zeitintervall	Totaler CO_2-Gehalt der Ausatmungsluft ausgedrückt in mg $BaCO_3$ A	Radioaktivität der Ausatmungsluft. Mittelwert aus 2 Einzelbestimmungen. counts/Min B	Oxydiertes Formiat in Prozent des eingegebenen Formiates. $C = \frac{B}{2^{\circ}154^{\circ}000} \times 100$
0 - 30 Min	1525	92°400	4.29
30 - 60	1427	168°100	7.81
60 - 90	1257	161°100	7.48
90 - 120	1292	145°800	6.77
120 - 150	1193	110°600	5.13
150 - 180	1083	67°200	3.12
3 - 4 Std	3010	64°500	2.99
4 - 5	2110	17°900	0.83
5 - 7	5240	22°600	1.02
7 - 9	4507	13°300	0.70
9 - 12	12410	19°600	0.91
12 - 24	23900	23°700	1.11

Tab. 4. Berechnung des aus dem ^{14}C-Formiat stammenden Ausatmungs-CO_2.

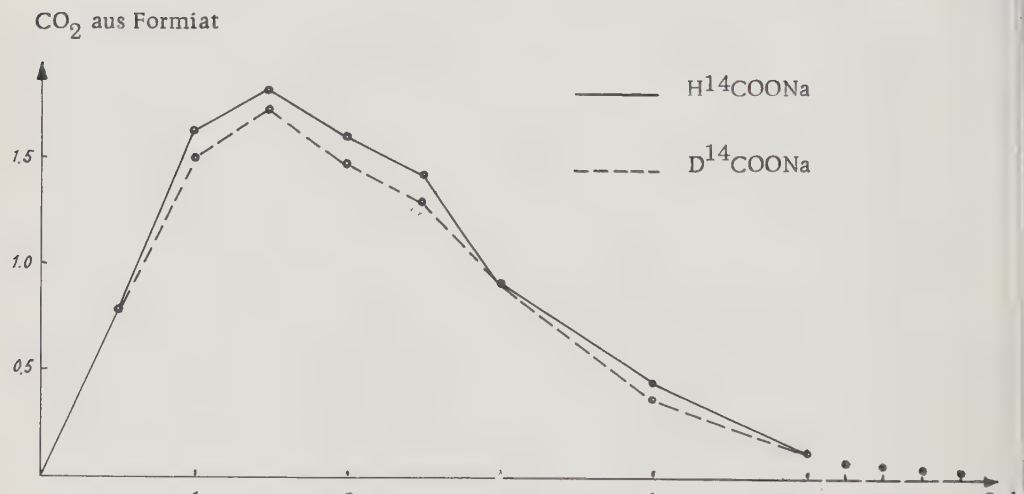
Zeitintervall	Oxydiertes Formiat. Absolutmenge in mg = C x 1.0695	Dem Formiat aequivalente Menge $BaCO_3$ Faktor = 2.9 D	CO_2 aus Formiat $E = \frac{D}{A} \times 100$
0 - 30 Min	4.58	13.30	0.87
30 - 60	8.35	24.20	1.70
60 - 90	7.99	23.19	1.84
90 - 120	7.24	20.98	1.62
120 - 150	5.48	15.90	1.33
150 - 180	3.33	9.66	0.89
3 - 4 Std	3.19	9.25	0.31
4 - 5	0.89	2.58	0.12
5 - 7	1.12	3.25	0.06
7 - 9	0.70	2.08	0.05
9 - 12	0.97	2.82	0.02
12 - 24	1.11	3.32	0.01

Die Tabelle 5 enthält die Werte der in den einzelnen Zeitabschnitten ausgeschiedenen CO_2-Menge, welche durch Oxydation aus dem peroral applizierten Formiat entstanden war. In Fig. 11 sind die Mittelwerte graphisch dargestellt.

Tab. 5. Ausatmungs-CO_2 aus dem peroral applizierten Formiat.

Zeitintervall	Ratte A $H^{14}COONa$ %	Ratte B $H^{14}COONa$ %	Ratte C $D^{14}COONa$ %	Ratte D $D^{14}COONa$ %
0 - 30 Min	0.76	0.74	0.87	0.71
30 - 60	1.49	1.80	1.70	1.28
60 - 90	1.76	1.91	1.84	1.65
90 - 120	1.59	1.59	1.62	1.32
120 - 150	1.37	1.44	1.33	1.10
150 - 180	1.01	0.75	0.89	0.88
3 - 4 Std	0.55	0.31	0.31	0.41
4 - 5	0.17	0.12	0.12	0.16
5 - 7	0.07	0.07	0.06	0.08
7 - 9	0.07	0.05	0.05	0.04
9 - 12	0.03	0.03	0.02	0.02
12 - 24	0.02	0.01	0.01	0.01

Fig. 11. Ausatmungs-CO_2 aus dem peroral applizierten Formiat (Mittelwerte).



B. Subkutane Belastung

Der Anteil Ausatmungs-CO_2, welcher aus dem injizierten Formiat stammte, wurde auf dieselbe Art berechnet wie im vorhergehenden Versuch.

Tab. 6. Ausatmungs-CO_2 aus dem subkutanen Formiat.

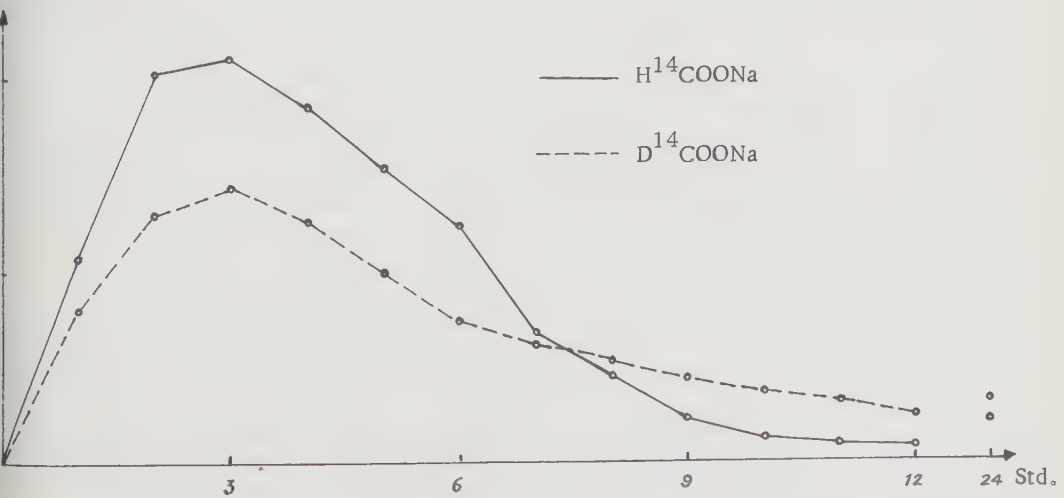
Dosis = 0.5 mAeq/100 g Körpergewicht

Zeitintervall	Ratte A $H^{14}COONa$ %	Ratte B $H^{14}COONa$ %	Ratte C $D^{14}COONa$ %	Ratte D $D^{14}COONa$ %
0 - 30 Min.	0.90	1.20	0.80	0.88
30 - 60	2.06	2.31	1.59	1.72
60 - 90	2.30	2.74	1.83	1.86
90 - 120	1.85	2.38	1.71	1.58
120 - 150	1.34	2.04	1.47	1.20
150 - 180	0.85	1.52	1.12	0.73
3 - 4 Std.	0.37	0.66	0.71	0.32
4 - 5	0.15	0.25	0.29	0.10
5 - 7	0.08	0.12	0.12	0.05
7 - 9	0.05	0.08	0.06	0.02
9 - 12	0.03	0.05	0.05	0.02
12 - 24	0.02	0.02	0.02	0.01

Fig. 12. Ausatmungs-CO_2 aus dem subkutan injizierten Formiat (Mittelwerte).

CO_2 aus Formiat

Dosis = 0.5 mAeq/100 g Körpergewicht



In einer weiteren Versuchsserie mit 6 Tieren wurde die Formiatoxydation bei einer höheren Dosierung (2.0 mAeq/100 g) verfolgt. Der Gaswaschflascheninhalt wurde stündlich untersucht.

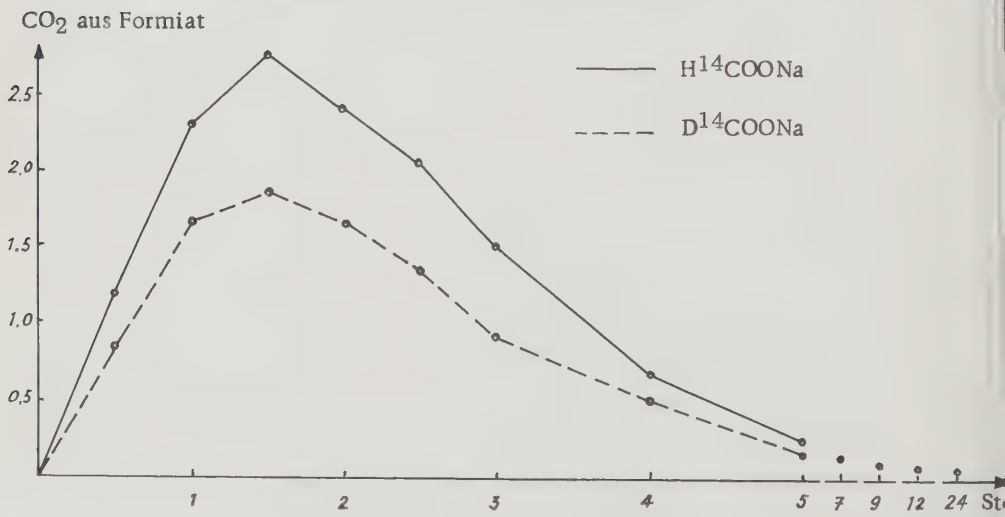
Tab. 7. Ausatmungs-CO_2 aus dem subkutan injizierten Formiat.

Dosis = 2.0 mAeq/100 g Körpergewicht.

Zeitintervall	Ratte A - C $H^{14}COONa$ %			Ratte D - F $D^{14}COONa$ %		
0 - 1 Std.	1.06	1.11	1.06	0.59	0.84	0.93
1 - 2	1.79	1.75	2.50	0.99	1.49	1.49
2 - 3	1.83	1.90	2.50	1.14	1.62	1.51
3 - 4	1.51	1.80	2.22	1.14	1.33	1.31
4 - 5	1.24	1.27	2.13	1.07	0.87	1.03
5 - 6	0.92	0.94	1.82	0.87	0.63	0.77
6 - 7	0.59	0.66	0.80	0.76	0.42	0.66
7 - 8	0.40	0.44	0.52	0.65	0.23	0.72
8 - 9	0.14	0.26	0.31	0.53	0.12	0.65
9 - 10	0.11	0.17	0.20	0.39	0.14	0.56
10 - 11	0.08	0.09	0.15	0.28	0.14	0.56
11 - 12	0.08	0.05	0.15	0.14	0.15	0.44
12 - 24	0.09	0.08	0.45	0.32	0.28	0.31

Fig. 13. Ausatmungs-CO_2 aus dem subkutan injizierten Formiat (Mittelwerte).

Dosis = 2.0 mAeq/100 g Körpergewicht.



C. Intraperitoneale Belastung

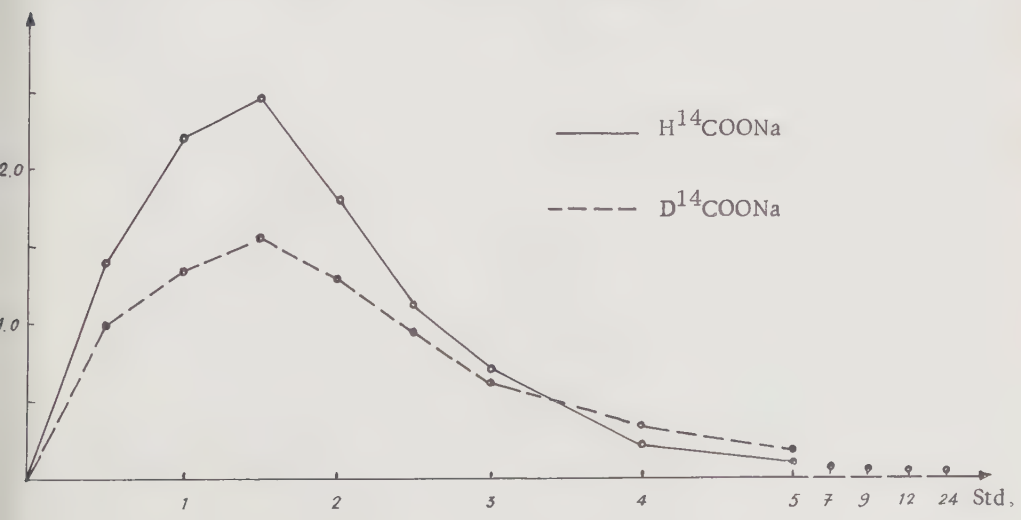
Die Berechnung des Ausatmungs-CO_2 erfolgte nach dem in Versuch A angeführten Beispiel.

Tab. 8. Ausatmungs-CO_2 aus dem intraperitoneal injizierten Formiat.

Dosis = 0.5 mAeq/100 g Körpergewicht.

Zeitintervall	Ratte A - D $H^{14}COONa$ %				Ratte E - I $D^{14}COONa$ %				
0 - 30 Min.	1.45	1.34	1.38	1.42	0.44	0.80	1.11	1.28	1.25
30 - 60	2.17	2.07	1.88	2.66	0.84	1.23	1,35	1.61	1.66
60 - 90	2.16	2.07	2.48	2.69	1.08	1.35	1.40	1.57	1.97
90 - 120	1.74	1.77	1.88	1.83	0.98	1.24	1.27	1.31	1.59
120 - 150	0.83	1.19	1.26	1.17	0.87	1.06	1.13	0.79	0.94
150 - 180	0.47	0.69	0.68	0.71	0.69	0.75	0.88	0.41	0.49
3 - 4 Std.	0.17	0.21	0.23	0.23	0.50	0.51	0.64	0.13	0.13
4 - 5	0.07	0.11	0.09	0.11	0.26	0.19	0.33	0.08	0.07
5 - 7	0.03	0.05	0.03	0.05	0.07	0.10	0.09	0.04	0.03
7 - 9	0.01	0.03	0.03	0.03	0.02	0.03	0.03	0.02	0.03
9 - 12	0.01	0.01	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.04
12 - 24	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02

Fig. 14. Ausatmungs-CO_2 aus dem intraperitoneal injizierten Formiat. (Mittelwerte)



II. DIE FORMIATAUSSCHEIDUNG IM HARN

Bei den vorliegenden Versuchen wurde einerseits echtes intramolekular doppeletikettiertes Natriumformiat ($D^{14}COONa + DCOONa$) und anderseits pseudodoppeletikettiertes Natriumformiat ($H^{14}COONa + DCOONa$) verwendet. Diese Substanzen unterscheiden sich dadurch, dass das Deuteriumatom fester an das Kohlenstoffatom gebunden ist, als dies beim Wasserstoffatom der Fall ist. Das Deuteriumatom lässt sich deshalb weniger gut durch das oxydierende Ferment vom Radikal ablösen.

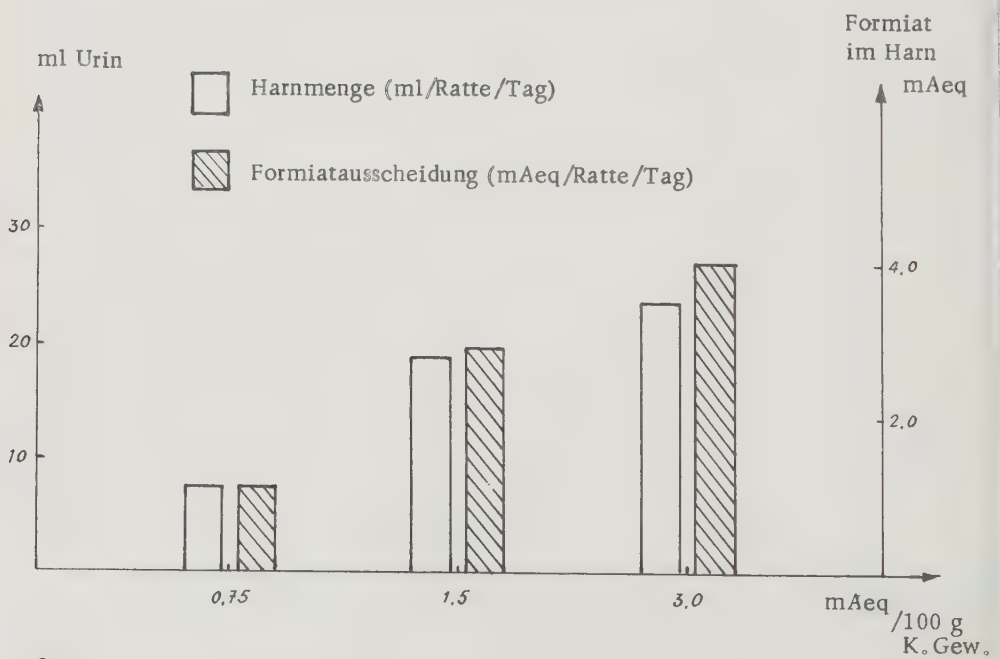
A. Subkutane Belastung

Es wurden beide Formiatarten in den drei Dosierungen von 0.75, 1.5 und 3.0 mAeq/100 g Körpergewicht eingespritzt. Die tägliche Menge Formiat wurde auf zwei Injektionen verteilt als 3n Lösung verabfolgt. Damit eine Isolierung des Formiates aus dem Harn möglich war, musste bei den niederen Dosierungen von 0.75 und 1.5 mAeq der Harn zweier aufeinanderfolgender Tage gemeinsam verarbeitet werden.

In Fig. 15 ist die Abhängigkeit der täglich produzierten Harnmenge von der Dosierung dargestellt.

Die im Harn ausgeschiedene Formiatmenge stieg bei beiden verwendeten Substanzen in gleicher Weise mit der Erhöhung der Dosis (Tabelle 9).

Fig. 15 Die Abhängigkeit der Harnmenge und der Formiatausscheidung von der Dosierung.



Tab. 9. Formiatausscheidung im Harn bei variabler Dosierung.
Vergleich zwischen dem ($D^{14}COONa$ + DCOONa) und dem ($H^{14}COONa$ + DCOONa).

Verwendetes Formiat	Eingespritzte Formiatmenge mAeq/100 g K.Gew.	Formiatmenge im Harn
Intramolekulare	0.75	0.64 mAeq = 31 %
Doppeletikettierung	1.5	1.60 mAeq = 43 %
$D^{14}COONa$ + $D^{12}COONa$	3.0	4.24 mAeq = 55 %
Pseudodoppel-	0.75	0.54 mAeq = 32 %
etikettierung	1.5	1.47 mAeq = 39 %
$H^{14}COONa$ + $D^{12}COONa$	3.0	4.11 mAeq = 52 %

Es wurde weiter die Radioaktivität des injizierten Formiates mit derjenigen des ausgeschiedenen Formates verglichen, indem der Quotient Q ausgerechnet wurde.

$$Q = \frac{\text{spezifische Aktivität des Harnformiates}}{\text{spezifische Aktivität des injizierten Formates}}$$

Bedingt durch die Isotopenverdünnung des Harnformiates entstand ein Quotient unter dem Wert eins (Tabellen 10 u. 11).

Tab. 10. Isotopenverdünnung beim intramolekular doppeletikettierten Formiat ($D^{14}COONa$ + DCOONa).

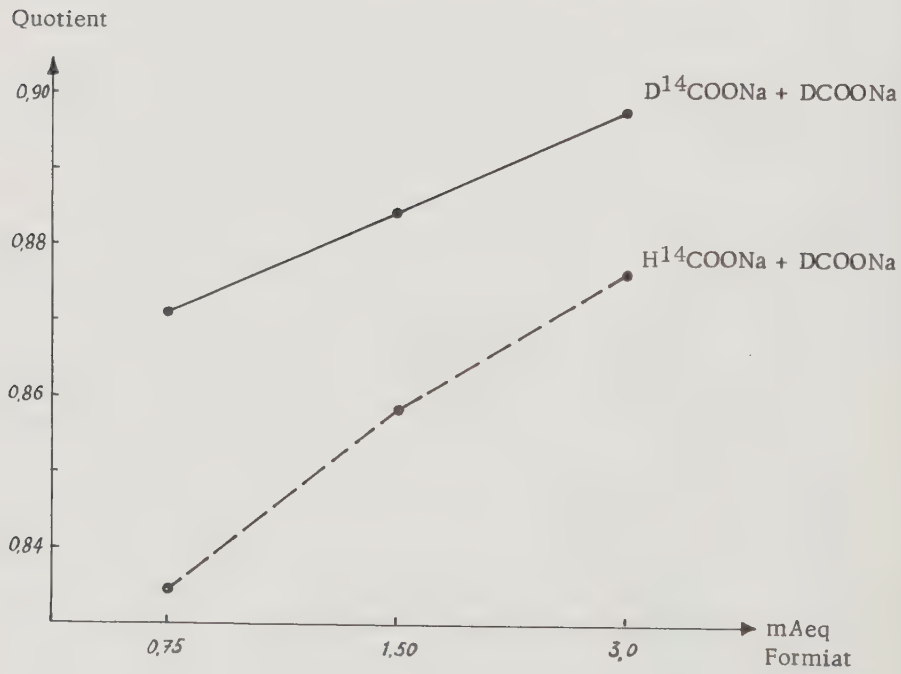
Subkutan eingespritzte Formiatmenge mAeq/100 g K.G.	Radioaktivität des injizierten Formates. counts/Min/mAeq A		Radioaktivität des Harnformiates Mittelwert aus 3 Bestimmungen. counts/Min/mAeq B	Quotient $Q = \frac{B}{A}$
0 75	56'400		45'500	0.835
1.5	54'600 53'500	54'500	46'800	0.858
3.0	53'600		47'800	0.877

Tab. 11. Isotopenverdünnung beim pseudodoppeletikettierten Formiat ($H^{14}COONa$ + DCOONa).

Subkutan injizierte Formiatmenge mAeq/100 g K.G.	Radioaktivität des injizierten Formiates. counts/Min/mAeq A		Radioaktivität des Harnformiates. Mittelwert aus 3 Bestimmungen. counts/Min/mAeq B	Quotient $Q = \frac{B}{A}$
0.75	56'400		45'500	0.835
1.5	54'600	54'500	46'800	0.858
3.0	53'500 53'600		47'800	0.877

Die in den Tabellen 10 und 11 erhaltenen Werte wurden in Fig. 16 aufgetragen.

Fig. 16. Abhängigkeit der Isotopenverdünnung von der Dosierung und der Art der ^{14}C-Etikettierung.



B. Perorale Belastung

Je zwei Tiere wurden mit echt intramolekular doppeletikettiertem und je zwei weitere mit pseudodoppeletikettiertem Formiat mit der Dosis 1.0 mAeq/100 g Körpergewicht belastet. Um eine genügende Menge Formiat im Harn zur Isolierung zur Verfügung zu haben, wurde der Harn dreier aufeinanderfolgender Tage zusammengeschüttet und gesamthaft verarbeitet. Es traten keine Unterschiede der Isotopenverdünnung bei den beiden Formiatarten auf (Tab. 12).

Tab. 12. Isotopenverdünnung bei peroral appliziertem Formiat.

Dosis = 1.0 mAeq/100 g Körpergewicht.

Verwendetes Formiat	Radioaktivität des applizierten Formiates counts/Min/mAeq A		Radioaktivität des ausgeschiedenen Formiates counts/Min/mAeq B	Quotient $Q = \frac{B}{A}$
Intramolekulare Doppeletikettierung $D^{14}COONa$ + DCOONa	56'000	56'800	53'200	0.946
	57'600		54'350	0.956
Pseudodoppeletikettierung $H^{14}COONa$ + DCOONa	58'200	57'500	54'350	0.945
	56'800		54'500	0.948

III. BILANZVERSUCHE

Es wurde versucht, eine angenäherte Uebersicht über das Schicksal des eingespritzten Formiates zu erhalten. Die Tiere wurden mit 2.0 mAeq Formiat pro 100 g Körpergewicht belastet. Am Schluss der Versuchsperiode, d.h. nach 24 Std., während welcher die Ausatmungsluft auf ihren Gehalt an $^{14}CO_2$ untersucht worden war, wurden die Ratten getötet, in kleine Stücke zerhackt und auf dem heissen Wasserbad in 200 ml 60 % Kalilauge gelöst. Ein aliquoter Teil wurde nach Neutralisation mit 5n Schwefelsäure nach der Methode von Van Slyke-Folch der feuchten Verbrennung unterworfen und die Radioaktivität des dabei gebildeten $^{14}CO_2$ bestimmt.

Durch Extrapolation konnte diejenige Anzahl Counts berechnet werden, die nach 24 Stunden noch im Rattenkörper vorhanden war. Diese Radioaktivität hatte ihren Grund in dem Vorhandensein von ^{14}C-haltigem Methionin, Cholin und Kreatin(in). Ferner wurde nach der oben beschriebenen Methode das Harnformiat bestimmt. Der Vollständigkeit halber wurde auch die Radioaktivität des Destillationsrückstandes ermittelt. Als Ursache dieser Radioaktivität war vor allem das Kreatinin anzusehen, dessen ^{14}C-Atom aus dem Methionin stammte, welches seine endständige, labile Methylgruppe an die Guanidinessigsäure abgegeben hatte. Die biologisch labile Methylgruppe des Methionins ihrerseits entstand durch Reduktion des injizierten Formiates ($H^{14}COONa \longrightarrow -^{14}CH_3$).

Tab. 13. Bilanz der Formiatumsetzung nach Belastung.

Dosis = 2.0 mAeq/100 g Körpergewicht.

Verwendetes Formiat	$H^{14}COONa$	$D^{14}COONa$
Gesamtradioaktivität des injizierten Formiates. Counts/Min.	904'900	795'400
Ausgeatmetes $^{14}CO_2$	258'400 counts/Min = 28.6 %	242'600 counts/Min = 30.5 %
Im Harn ausgeschiedenes Formiat	2.27 mAeq = 39.8 %	1.89 mAeq = 35.8 %
Radioaktivität des Destillationsrückstandes	77'800 counts/Min = 8.6 %	74'000 counts/Min = 9.3 %
Radioaktivität des Rattenkörpers	86'300 counts/Min = 9.5 %	85'000 counts/Min = 10.7 %
	Summe 87 %	86 %

DISKUSSION

I. ISOTOPIEEFFEKTE BEI DER FORMIATOXYDATION

Nach subkutaner und besonders nach intraperitonealer Belastung zeigten leichtes ($H^{14}COONa$) und schweres ($D^{14}COONa$) Formiat ein unterschiedliches Verhalten bei ihrer Oxydation. Der grösste Unterschied wurde anderthalb Stunden nach Injektion des Formiates beobachtet. Der zeitliche Verlauf der Oxydation war in beiden Fällen analog, hingegen wurde in den ersten drei Stunden gesamthaft mehr leichtes als schweres Formiat oxydiert.

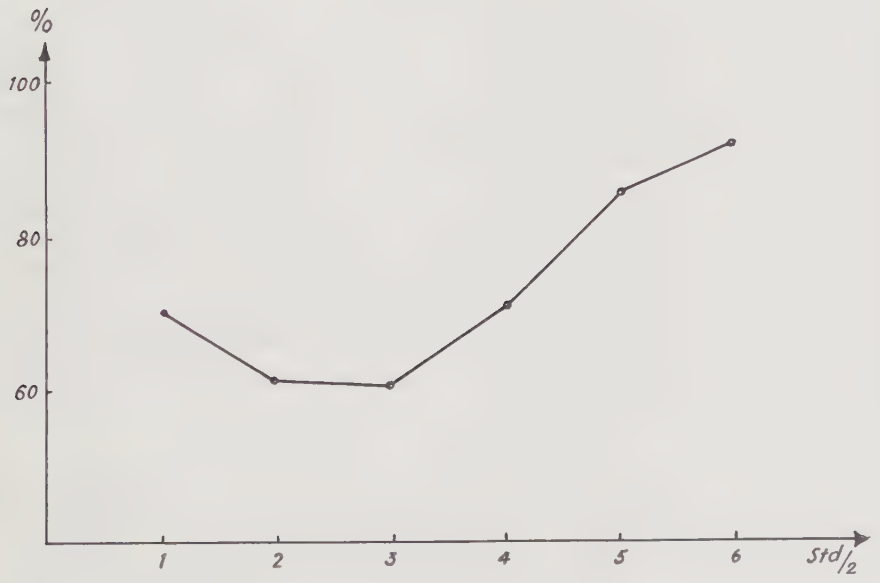
In Fig. 17 wurden die bei intraperitonealer Applikation in den einzelnen Zeitabschnitten (30 Min.) aus dem leichten und schweren Formiat gebildeten $^{14}CO_2$-Menge miteinander verglichen. Die aus dem leichten Formiat stammende $^{14}CO_2$-Menge wurde zu diesem Zweck = 100 gesetzt und der entsprechende Wert für das aus dem schweren Formiat gebildete $^{14}CO_2$ berechnet.

Zahlenwerte für Fig. 17

Zeitintervall Min.	CO in der Ausatmungsluft aus $H^{14}COONa$ % A	CO in der Ausatmungsluft aus $D^{14}COONa$ % B	$\frac{B}{A} \times 100$
0 - 30	1.398	0.977	69.9
30 - 60	2.197	1.338	60.9
60 - 90	2.456	1.473	60.0
90 - 120	1.804	1.278	70.8
120 - 150	1.112	0.958	86.2
150 - 180	0.710	0.645	90.8

Fig. 17. Isotopieeffekt. Vergleich der Oxydation von $H^{14}COONa$ und $D^{14}COONa$.
Abszisse: Zeit

$$\text{Ordinate: } \frac{CO_2 \text{ aus } D^{14}COONa}{CO_2 \text{ aus } H^{14}COONa} \times 100$$



Stammten in der zweiten bis vierten Halbstunde 100 Einheiten CO_2 aus dem leichten Formiat, so waren dies beim schweren Formiat nur 60 bis 70 Einheiten. In der fünften und sechsten Halbstunde näherte sich das Verhältnis dem Wert 100. In diesem Zeitpunkt wurde der Isotopieeffekt geringer, da die beiden verwendeten Formiatarten in ungefähr gleicher Weise oxydiert wurden.

Bei der peroralen Applikation ergaben sich keine derartigen Isotopieeffekte, d.h. die Oxydation von $H^{14}COONa$ und $D^{14}COONa$ lag in derselben Grössenordnung (vgl. Fig. 11);

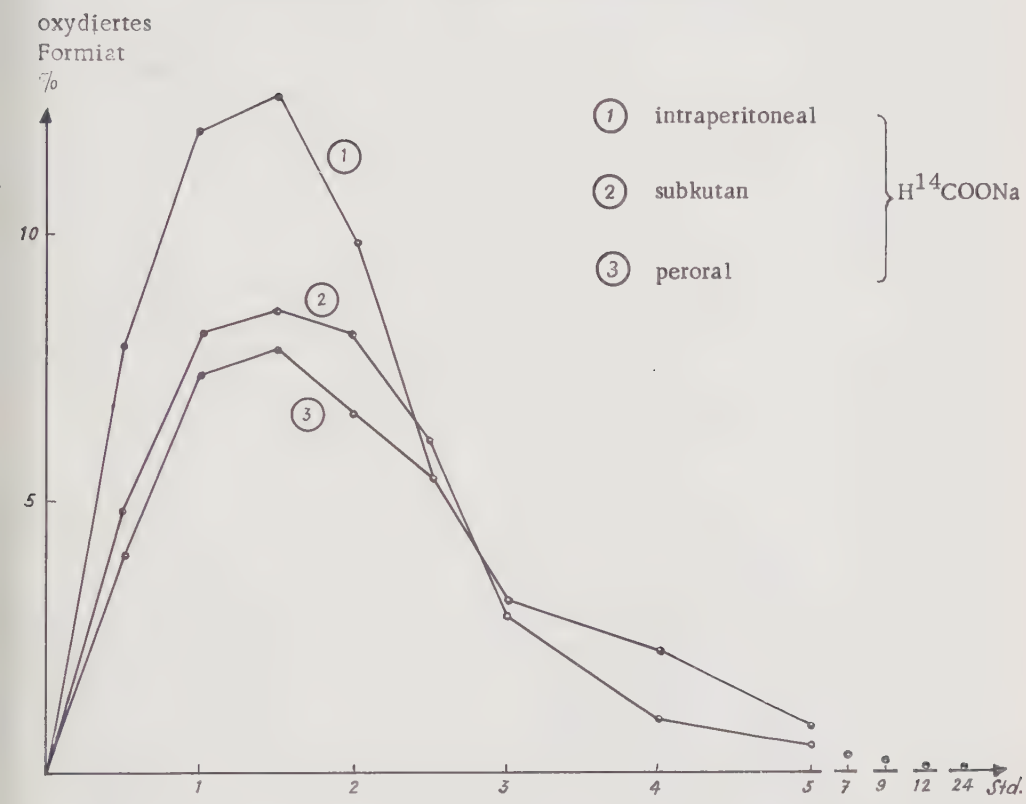
Das Zustandekommen dieses Isotopieeffektes muss man sich so vorstellen, dass das Deuteriumatom fester an das Kohlenstoffatom (D-C-) gebunden ist, als das Wasserstoffatom (H-C-). Es stellt einer Ablösung durch das oxydierende Ferment offenbar grösseren Widerstand entgegen, als das beim leichter ablösbaren H-Atom der Fall ist. Das schwere Formiat ($D^{14}COONa$) wird deshalb bei gleichem Substratangebot weniger rasch durch die Leber oxydiert als das leichte Formiat ($H^{14}COONa$). Dieser Unterschied in der Oxydation offenbart sich besonders bei der intraperitonealen und subkutanen Injektionsart (vgl. Fig. 14 u. 12).

Dass bei intraperitonealer Belastung die grössten Effekte auftreten, ist möglicherweise auf die unterschiedlichen Verhältnisse bei der Resorption zurückzuführen. In diesem Fall erfolgt der Uebertritt des Formiates in den Blutkreislauf infolge des Gefässreichtums und der grossen Fläche des Peritoneums sehr rasch. Der Formiatblutspiegel erreicht damit sofort relativ hohe Werte, sodass das oxydierende Fermentsystem der Leber voll mit Substrat gesättigt wird. In diesem Augenblick, d.h. während der ersten drei Stunden nach der Applikation, wird der Oxydationsunterschied zwischen dem leichten und schweren Formiat am augenfälligsten. Bei der subkutanen Applikationsart herrschen wegen der ebenfalls guten Resorptionsverhältnisse ähnliche Bedingungen, sodass die Isotopieeffekte auch in diesem Fall deutlich zutage treten. Wird das Formiat hingegen auf peroralem Wege in den Körper gebracht, so wird dasselbe im Magendarmkanal viel langsamer resorbiert als in den beiden andern Fällen. Der Formiatblutspiegel steigt nur langsam an und erreicht nie besonders hohe Werte. Dieses protrahiert erfolgende Angebot an Formiat vermag die Leber in beiden Fällen ($H^{14}COONa$ und $D^{14}COONa$) in gleicher Weise umzusetzen, sodass Isotopieeffekte ausbleiben.

Ein Vergleich der drei Applikationsarten (Fig. 18) zeigt, dass bei gleicher Dosierung mit ein und demselben Formiat (0.5 mAeq/100 g Körpergewicht $H^{14}COONa$) das intraperitoneal injizierte Formiat die schnellste Umsetzung erfährt. Das subkutane und perorale Formiat werden in geringerem Grade und ungefähr in der gleichen Grössenordnung oxydiert. Diese Unterschiede sind sehr wahrscheinlich durch die verschiedene Resorptionsgeschwindigkeit bedingt.

Fig. 18. Vergleich der Oxydationsgeschwindigkeit bei intraperitonealer, subkutaner und peroraler Applikation von $H^{14}COONa$.

Abszisse: Zeit Ordinate: oxydiertes Formiat in %



Zur zahlenmässigen Erfassung der unterschiedlichen Oxydationsgeschwindigkeiten wurde die innert drei Stunden veratmete Formiatmenge einer vergleichenden Betrachtung unterzogen. In diesem Zeitpunkt war die Formiatoxydation schon zu 80 - 90 % erfolgt. In Tabelle 14 wurde das prozentuale Ausmass der Oxydation bei verschiedenen Applikationsarten zusammengestellt (Dosis = 0.5 mAeq/100 g). Tabelle 15 gibt die Verhältnisse bei subkutaner Belastung und verschiedener Dosierung wieder.

Tab. 14. Formiatoxydation bei Variation der Applikationsweise.

Dosis = 0.5 mAeq/100 g Körpergewicht.

Applikationsart	In den 3 ersten Stunden oxydiertes Formiat. Mittelwert aus 2 Bestimmungen. %	Prozentualer Unterschied. (oxydiertes $H^{14}COONa$ = 100 %)
per os		
$H^{14}COONa$	35.3	89 %
$D^{14}COONa$	31.5	
subkutan		
$H^{14}COONa$	39.4	89 %
$D^{14}COONa$	35.1	
intraperitoneal		
$H^{14}COONa$	50.1	73 %
$D^{14}COONa$	36.5	

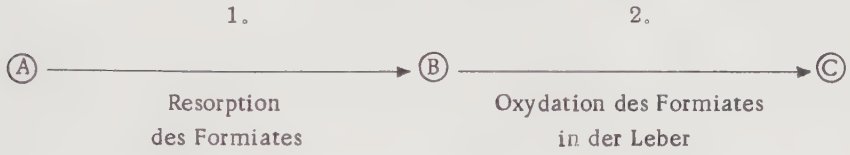
Diese Werte bestätigen die oben angeführten Unterschiede in der Oxydation. Bei allen Applikationsarten war nach drei Stunden gesamthaft weniger schweres Formiat ($D^{14}COONa$) als leichtes Formiat ($H^{14}COONa$) oxydiert worden. In der Bilanz trat das grösste unterschiedliche Verhalten der beiden verwendeten Formiatarten ebenfalls nach der intraperitonealen Belastung zutage. Weiter betrug der nach drei Stunden erzielte Umsatz bei der intraperitonealen Injektion rund die Hälfte des verabreichten Formiates. Bei beiden andern Applikationsarten wurde weniger oxydiert (rund 35 resp. 39 %). Aehnliche, jedoch geringere Unterschiede liessen sich mit dem schweren Formiat ($D^{14}COONa$) erzielen.

Tab. 15. Formiatoxydation bei Variation der Dosierung.

Subkutan eingespritzte Formiatmenge	In den 3 ersten Stunden oxydiertes Formiat Mittelwert aus 2 Bestimmungen. %	In den 3 ersten Stunden oxydierte Absolutmenge Formiat. mg
0.5 mAeq/100 g		
$H^{14}COONa$	39.4	37.7
$D^{14}COONa$	35.1	29.2
2.0 mAeq/100 g		
$H^{14}COONa$	10.9	38.6
$D^{14}COONa$	7.8	28.8

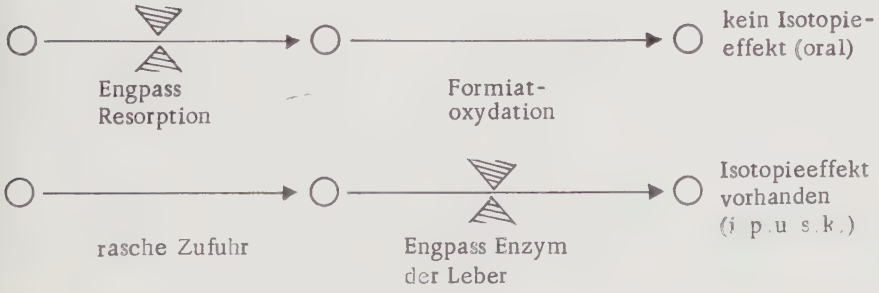
Aus der Tabelle 15 ist ersichtlich, dass bei subkutaner Belastung mit einer geringen Dosis von 0.5 mAeq/100 g nach drei Stunden 39.4 % des eingespritzten leichten Formiates oxydiert worden sind. Bei höherer Dosierung (2.0 mAeq/100g) betrug die Oxydation nur 10.9 % der ursprünglich eingegebenen Substanz. Absolut gerechnet waren indessen in beiden Versuchsanordnungen gleich viel Formiat zu CO_2 oxydiert worden. Nach drei Stunden betrug die oxydierte Absolutmenge Formiat (bei der Dosierung von 2.0 mAeq/100g) für das $H^{14}COONa$ rund 38 mg. In beiden Fällen war offenbar im Fermentsystem der Leber eine Sättigung erreicht. Die Zahl von 38 mg muss als oberer Grenzwert angesehen werden, weil offenbar bei subkutaner Belastung in drei Stunden nicht mehr als diese Menge Formiat oxydiert werden kann.

Das Vorhandensein eines Isotopieeffektes erlaubt die Entscheidung, welcher Schritt in einer Reaktionsfolge A → B → C geschwindigkeitsbegrenzend ist. Bei den vorliegenden Versuchen kann erstens die Resorption, zweitens die Oxydation des Formiates in der Leber die Geschwindigkeit des Reaktionsablaufes bestimmen:



Bei peroraler Belastung beeinflusste die Geschwindigkeit, mit welcher das Formiat im Magendarmkanal resorbiert wurde, den weitern Ablauf der Reaktionsfolge. Es kam kein Isotopieeffekt zustande, weil infolge der langsamen Resorption die Leber nur mit relativ geringen Substratmengen belastet wurde. Bei der subkutanen und intraperitonealen Applikation (rasche Aufnahme des Formiates in das Blut) trat ein Isotopieeffekt auf, da in diesem Falle das Enzymsystem der Leber den Engpass in der Reaktionsfolge darstellte (Fig. 19).

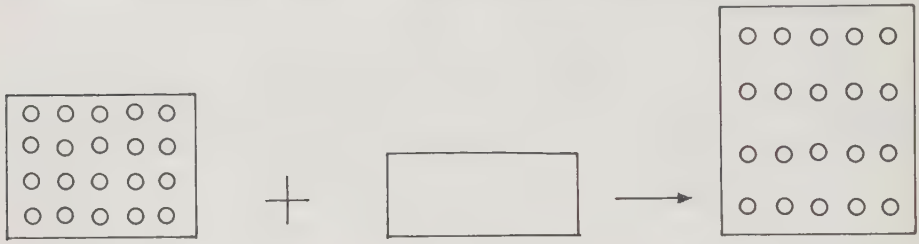
Fig. 19



II. BERECHNUNG DES ENDOGEN GEBILDETEN FORMIATES

Radioaktives ^{14}C-Formiat erfährt im Organismus eine Verdünnung durch endogenes, inertes Formiat, sodass das im Harn ausgeschiedene Formiat eine geringere Aktivität aufweist als das ursprünglich injizierte Formiat (Fig. 20). Das endogene Formiat stammt zur Hauptsache aus der Nahrung.

Fig. 20. Schematische Darstellung der Isotopenverdünnung bei Formiatbelastung.



Injiziertes Formiat

spez. Aktiv. $= \frac{^{14}C}{^{12}C + ^{14}C} = a$

Endogenes inertes Formiat ^{12}C

Harnformiat (Isotopenverdünnung) spez. Aktivität $= \frac{^{14}C}{^{12}C + ^{14}C} = a - x$

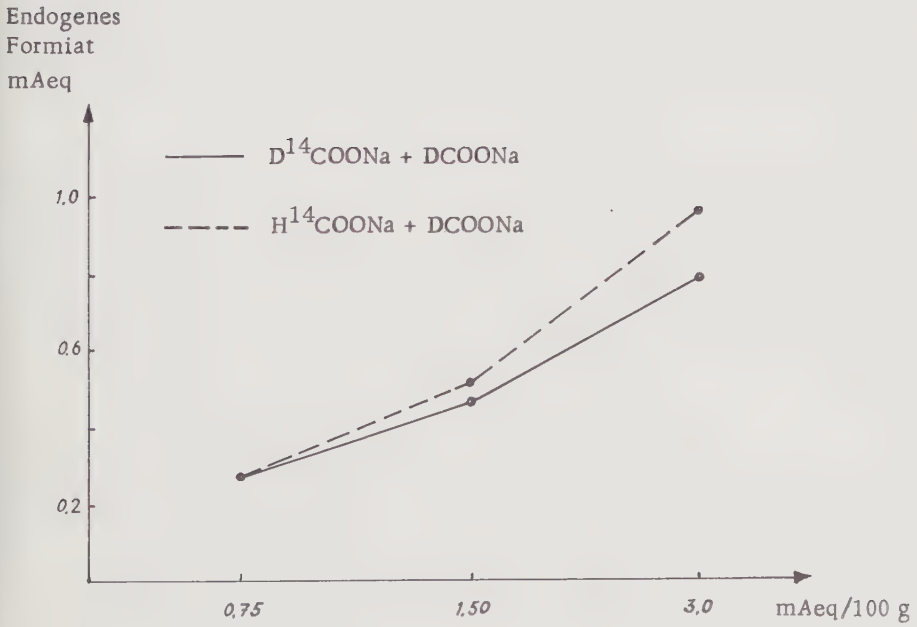
Aus Fig. 16 geht hervor, dass sich der Quotient, gebildet aus der Radioaktivität des eingespritzten und derjenigen des im Harn ausgeschiedenen Formiates bei steigender Dosierung dem Wert = 1 nähert. Anders ausgedrückt bedeutet dies eine Abnahme der Isotopenverdünnung. Es werden bei kleiner Dosierung verhältnismässig grössere endogene Formiatmengen ausgeschieden, sodass das Harnformiat mehr inertes Formiat enthält. Bei hoher Dosierung fällt das endogene, inerte Formiat weniger ins Gewicht, und die Isotopenverdünnung wird geringer.

Aus dem Quotienten liess sich das mitausgeschiedene Formiat endogenen Ursprungs berechnen. Betrug z.B. der Quotient 0.884 , so mussten 0.116 Einheiten oder 11.6 % inertes Formiat aus dem intermediären Stoffwechsel stammen. Wenn man annimmt, dass endogenes Formiat in gleicher Weise zu CO_2 oxydiert und im Harn ausgeschieden wird, beträgt in diesem Falle bei einer Zufuhr von 3.74 mAeq radioaktiven Formiates das total umgesetzte endogene Formiat 0.43 mAeq. Die Resultate dieser Berechnung wurden in Tabelle 16 zusammengestellt und die erhaltenen Werte in Fig. 21 graphisch aufgetragen. Es zeigte sich, dass mit steigender Dosierung etwas mehr endogenes Formiat vom Organismus abgegeben wird.

Tab. 16. Bildung endogenen Formiates in Abhängigkeit von der Dosierung.

Verwendetes Formiat	Eingespritzte Formiatmenge mAeq	Quotient	Endogenes Formiat %	Endogenes Formiat	
				absolut mAeq	pro 100g K. Gew.
$D^{14}COONa$	0.75/100g = 2.08	0.871	12.9	0.27	0.09
+	1.50/100g = 3.74	0.884	11.6	0.43	0.18
DCOONa	3.00/100g = 7.63	0.897	10.3	0.79	0.31
$H^{14}COONa$	0.75/100g = 1.63	0.835	16.5	0.27	0.12
+	0.50/100g = 3.62	0.858	14.2	0.51	0.21
DCOONa	3.00/100g = 7.91	0.877	12.3	0.97	0.37

Fig. 21. Die Ausscheidung von endogen gebildetem Formiat bei variabler Dosierung.



ZUSAMMENFASSUNG

1. Nach Belastung von Ratten mit Dosen von 0.5 - 3.0 mAeq ^{14}C-Formiat (pro 100 g Körpergewicht), ist die $^{14}CO_2$-Abgabe in der Atemluft, sowie die Formiatausscheidung im Harn messend verfolgt worden.

2. Die laufend vorgenommene Bestimmung der $^{14}CO_2$-Abgabe hat ergeben, dass die Geschwindigkeit, mit der Formiat zu CO_2 oxydiert wird, von der Applikationsweise sowie von der Art des im Formiat vorhandenen Wasserstoffisotops (HCOONa; DCOONa) abhängt.

3. Am intensivsten erfolgt die Oxydation nach intraperitonealer Belastung, bei welcher auch ein Isotopieeffekt am deutlichsten in Erscheinung tritt. Die Oxydationsgeschwindigkeiten für leichtes und schweres Formiat ($H^{14}COONa$ resp. $D^{14}COONa$) weichen im Zeitpunkt der intensivsten $^{14}CO_2$-Abgabe (60-90 Minuten nach der Belastung) am weitesten voneinander ab und verhalten sich wie $H^{14}COONa : D^{14}COONa = 1 : 0.6$

4. Das im Harn ausgeschiedene und als Bleisalz isolierte Formiat zeigte gegenüber der injizierten Verbindung eine Abnahme der spezifischen Aktivität, was auf eine Isotopenverdünnung durch endogen gebildetes Formiat zurückzuführen ist. Die auf Grund dieser Daten angestellten Berechnungen haben ergeben, dass im Organismus der Ratte täglich ca 0.1 - 0.3 mAeq Formiat pro 100 g Körpergewicht neu gebildet werden.

5. Die bei der Passage des Formiates durch den Organismus zu beobachtende Abnahme der spezifischen Aktivität hängt schliesslich noch von der Art der Doppeletikettierung und von der Dosierung ab. Diese Abnahme tritt nach Belastung mit pseudodoppeletikettiertem Formiat ($H^{14}COONa + D^{12}COONa$) stärker in Erscheinung als dies beim echten, intramolekular doppeltetikettiertem Formiat ($D^{14}COONa$) der Fall ist.

Meinem Lehrer Herrn Prof. H. Aebi bin ich für seine Anleitung und wirksame Unterstützung zu grossem Dank verpflichtet.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Du Vigneaud, V.: A Trail of Research Cornell University Press, Ithaca New York (1952)

2. Zakrewski, S.F. and Ch.A. Nichol: J. Biol. Ch 213, 697 (1955)

3. Weinhouse, S. and B. Friedmann: J. Biol. Ch. 197, 733 (1952) J. Biol. Ch. 210, 413 (1954)

4. Ch. Ressler, Rachele, J.R. and Du Vigneaud, V.: J. Biol. Ch. 197, 1 (1952)

5. von Fellenberg, Th.: Bioch. Zeitschr. 85, 45 (1917)

6. Calvin, M.: Isotopic Carbon S. 92 John Wiley New York (1949)

7. Du Vigneaud, V., W.G. Verly and J.E. Wilson: J. Am. Chem. Soc. 72, 2819 (1950)

8. Hawk, P.B. and Oser, B.L.: Practical Physiological Chemistry S. 1273, 12. Aufl. The Blakiston Company Philadelphia (1949)

9. Diverse Autoren: Neuere Massanalytische Methoden, S. 111 Verlag Enke, Stuttgart (1951)

10. Aebi, H., W. Buser und Chr. Lüthi: Helv. Chim. Acta 39, 944 (1956)